Aus den Medizinischen Kliniken und Polikliniken
Klinik D, der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. G. Strohmeyer

Einfluß einer chronischen Vorbehandlung mit Alkohol auf die Leberzellschädigung durch Dimethylnitrosamin

D I S S E R T A T I O N
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
vorgelegt von
Michaela Haydn
~~1981~~
1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Aus den Medizinischen Kliniken und Polikliniken
Klinik D, der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. G. Strohmeyer

Einfluß einer chronischen Vorbehandlung mit Alkohol auf die Leberzellschädigung durch Dimethylnitrosamin

D I S S E R T A T I O N
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
vorgelegt von
Michaela Haydn
1981

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Brüster

Referent
gez.: Priv. Doz. Dr. Teschke

Korreferent
gez.: Prof. Dr. Frenzel

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 2

2. Material und Methoden 5

2.1 Materialien 5

2.2 Versuchstiere 6

2.3 Zusammensetzung und Herstellung des Futters 7

2.4 Isokalorische Fütterung 11

2.5 Applikation von Dimethylnitrosamin 12

2.6 Materialaufarbeitung 14

2.7 Biochemische Bestimmungsmethoden 15

2.7.1 Glutamat-Dehydrogenase 15

2.7.2 Glutamat-Oxalacetat-Transaminase 15

2.7.3 Glutamat-Pyruvat-Transaminase 16

2.7.4 Alkalische Phosphatase 16

2.7.5 Glutathion 17

3. Ergebnisse 18

3.1 Serumenzyme 18

3.2 Leberenzyme 26

3.3 Glutathion 30

3.4 Histologische Befunde 31

4. Diskussion 39

5. Zusammenfassung 45

6. Literaturverzeichnis 47

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538101_0042

Abkürzungen

AP	Alkalische Phosphatase
DMN	Dimethylnitrosamin
GGT	Gamma-Glutamyltransferase
GLDH	Glutamat-Dehydrogenase
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
NADP	Nicotinamid-dinucleotidphosphat

1. Einleitung

Schon seit Mitte der fünfziger Jahre ist Dimethylnitrosamin (DMN) als eine Substanz bekannt, die experimentelle Lebertumoren erzeugen kann (26). Im Jahre 1974 wurde dann das DMN auf Veranlassung der Occupational Safety and Health Administration (OASH) in das Register der kanzerogenen Stoffe aufgenommen. Neben dieser kanzerogenen Eigenschaft besitzt das DMN auch eine starke mutagene (27, 33) und hepatotoxische (2, 28, 36) Wirkung.

Der Kontakt des Menschen mit Nitrosaminen, speziell DMN, kann in vielfältiger Form erfolgen. So ist DMN Bestandteil verschiedener Nahrungs- und Genußmittel. Es konnte in unterschiedlichen Konzentrationen in rohem, geräuchertem oder gebackenem Fisch (6, 15), Schinkenspeck und Rauchfleisch (11), Salami (35), Frankfurter Würstchen (41), Käse (6), Alkohol (24) und Tabakrauch (17) nachgewiesen werden. In der Umwelt finden sich Nitrosamine in geringen Konzentrationen, außerdem in Auspuffgasen, synthetischen Waschmitteln und Farben sowie im Fischmehl, das in hohem Maße als Tierfutter Verwendung findet (14, 16).

Nitrosamine können auch durch Zusammentreffen von Aminen mit Nitriten oder Stickoxyden in der Umwelt und im Körper entstehen. Nitrite entwickeln sich durch bakterielle oder pflanzenenzymatische Reduktion von Nitraten (34). Eine der wesentlichen Hauptquellen für Nitrate sind Düngemittel, die

in den Boden eingebracht werden. Durch Nahrungsmittel, wie Gemüse und Salat, können sie in den menschlichen Organismus gelangen und dort mit Aminen zu Nitrosaminen reagieren. Infolge der leichten Löslichkeit in Wasser gelangen Nitrite auch mit dem Regen in das Grundwasser und von dort in das Trinkwasser. Eine weitere Quelle für Nitrite sind gepökelte Fleisch- und Wurstwaren (11).
Zwanzig Prozent der den Magen erreichenden Nitrite stammen direkt aus den Nahrungsmitteln, während der Rest im Speichel gebildet wird (25). Wenn im Magen-Darm-Trakt außer Nitriten auch Amine vorhanden sind, können sich Nitrosamine bilden (24). Diese in vivo Bildung von DMN wurde an einem Probanden nachgewiesen, der einen erhöhten DMN-Spiegel im Serum nach einer Mahlzeit aufwies, die aus Brot, Schinken, Tomaten, Salat und Bier bestand (17). Die dabei aufgenommenen Nahrungsmittel enthielten selbst keine Nitrosamine.

DKFZ-BIBLIOTHEK

Verschiedene Studien haben gezeigt, daß sich die durch eine Reihe von Substanzen wie Tetrachlorkohlenstoff, Paracetamol oder Chlorpromazin entstehende Leberzellschädigung durch chronische Vorbehandlung mit Alkohol beeinflussen läßt. Es konnte nachgewiesen werden, daß eine mehrwöchige Alkoholvorbehandlung zu einer Steigerung der Leberzellschädigung durch Tetrachlorkohlenstoff (20) und Paracetamol (39) führt. Außerdem konnte eine Chlorpromazin-induzierte Cholestase durch Alkoholvorbehandlung verstärkt werden (40). Diese Ergebnisse sind insofern von wichtiger klinischer Bedeutung, als Alkoholiker häufig zusätzlich andere Substanzen einschließlich Arzneimittel zu sich nehmen, die potentiell eine verstärkte

Leberschädigung hervorrufen können.

Die gesteigerte Toxizität von Tetrachlorkohlenstoff, Paracetamol und Chlorpromazin wurde auf einen beschleunigten Metabolismus dieser Substanzen zu toxischen Abbauprodukten zurückgeführt.

Frühere Untersuchungen (32) haben gezeigt, daß die Gabe von Phenobarbital als einem klassischen Induktor mikrosomaler Enzyme zu einer Reduktion der Leberzellschädigung durch Nitrosamine führt. In der folgenden Studie sollte daher der Frage nachgegangen werden, welchen Einfluß eine chronische Vorbehandlung mit Alkohol als einem anderen mikrosomalen Enzym-Induktor auf die Leberzellschädigung durch Dimethylnitrosamine hat. Der Versuch wurde an Ratten durchgeführt, wobei die Untersuchung der Lebertoxizität enzymatisch durch Bestimmung der Aktivität von Leberenzymen im Serum erfolgte. Außerdem wurde die Leber histologisch untersucht und der Glutathiongehalt der Leber bestimmt.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

Für die Flüssigdiät wurden die Substanzen von folgenden Firmen bezogen:

L-Cystin, DL-Methionin, Thiamindichlorid, Riboflavin, Pyridoxinhydrochlorid, Ca-D(+)-panthothenat, Nicotinsäureamid, Cholinchlorid, Biotin, Folsäure, Menadion, Vitamin B 12, 4-Aminobenzoesäure, Vitamin-A-acetat, Calciferol und DL- -Tocopherolacetat von Merck, Darmstadt;
Casein (vitaminfrei) und Meso-(-i)-Inosit von Serva, Heidelberg;
Linolsäureethylester von Roth, Karlsruhe;
Malto-Dextrin von Maizena/Pomps, Heilbronn;
Carraghenan von Sigma Corporation, St. Louis;
Salt-Mixture "Hegsted" von ICN Pharmaceutics Inc., Cleveland.

Für die Versuche wurde weiterhin benötigt:

Dimethylnitrosamin von Merck/Suchard, Darmstadt;
GLDH-Monotest, GOT UV-Test, GPT UV-Test, Alkalische Phosphatase-Test, GGT-Monotest von Böhringer, Mannheim;
Glutathion von Merck, Darmstadt;
5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoesäure) von Sigma, St. Louis.

2.2 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten weibliche Sprague-Dawley Ratten mit einem anfänglichen Körpergewicht von 180 - 200 Gramm, die vom Zentralinstitut für Versuchstierzucht in Hannover bezogen wurden. Die Tiere wurden in einem Raum mit konstanter Temperatur von 22 $\pm$ 1 ^{o}C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 $\pm$ 5 %, einem Luftdruck von 4 - 6 mm H_2O, und einem zwölfstündigem Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Während einer Dauer von drei Wochen bis zum eigentlichen Versuchsbeginn erhielten sie Altrumin-R-Trockenfutter und Wasser ad libitum.

2.3 Zusammensetzung und Herstellung des Futters

Während einer Gesamtdauer von drei Wochen erhielten die Ratten als einzige Nahrungs- und Wasserquelle eine flüssige Diät, die entweder Alkohol (Alkohol-Diät) oder isokalorisch Kohlenhydrate (Kontroll-Diät) enthielt (7). Diese Diäten sind ernährungsmäßig vollwertig und enthalten eine Kilocalorie pro ml (entsprechend 4,2 kJ/ml).
Bei beiden Diäten setzen sich die Gesamtkalorien wie folgt zusammen:

- Protein (18 % der Gesamtkalorien) in Form von Casein, angereichert mit Methionin (0,3 mg/ml) und Cystin (0,5 mg/ml);

- Fett (35 % der Gesamtkalorien) als Oliven- und Maisöl mit 2 % der Gesamtkalorien als Linolsäureethylester;

- Kohlenhydrate (47 % der Gesamtkalorien in der Kontroll-Diät) in Form von Malto-Dextrin.

- In der Alkohol-Diät wurde ein Teil der Kohlenhydrate (36 % der Gesamtkalorien) durch Ethanol ersetzt. Die Alkohol-Diät enthielt somit fünfzig Gramm reinen Alkohol pro Liter.

- Mineralstoffe und Vitamine wurden in der von DeCarli und Lieber (7) vorgeschlagenen Menge zugegeben.

Die einzelnen Bestandteile der Diät wurden mit salzfreiem Wasser in einem Starmix gemischt.
Zur besseren Emulgierung erfolgte die Behandlung der Diäten auf einem Schüttelgerät. Anschließend wurden die Diäten in einer Kühlkammer bei 4 °C gelagert und innerhalb der nächsten drei Tage verbraucht.

Bestandteile in 1 Liter Diät

Substanz	Kontroll-Diät	Alkohol-Diät
Casein	41,4 g	41,4 g
Methionin	0,3 g	0,3 g
L-Cystin	0,5 g	0,5 g
Salt-Mixture "Hegsted"	10,0 g	10,0 g
Maisöl	8,5 g	8,5 g
Olivenöl	28,5 g	28,5 g
Linolsäureethylester	2,7 g	2,7 g
Malto-Dextrin	115,9 g	24,9 g
Viscarin (Carrageenan)	2,0 g	2,5 g
Vitamin-Mix	5,0 g	5,0 g
Alkohol	0,0 g	50,0 g
salzfreies Wasser	auf 1 l	auf 1 l

Das Salz wurde als komplette Mischung "Hegsted" verschiedener Mineralsalze zugesetzt.

Bestandteile des Vitamin-Mix für 1 Liter Diät

Substanz	Menge
Thiamin	0,725 mg
Riboflavin	1,25 mg
Pyridoxinhydrochlorid	0,725 mg
Calciumpanthothenat	5,0 mg
Nicotinamid	3,75 mg
Cholinchlorid	250,00 mg
Biotin	0,025 mg
Folinbenzoesäure	0,25 mg
Inosit	25,0 mg
Methyl-1,4-Naphthochinon	0,25 mg
Vitamin B 12	0,025 mg
p-Aminobenzoesäure	12,5 mg
Vitamin A-acetat	2,0 mg
Calciferol	0,01 mg
DL- -tocopherolacetat	30,0 mg
Glucose	4.700,5 mg

2.4 Isokalorische Fütterung

Während der Versuchsdauer wurden die Ratten in Einzelkäfigen aus Aluminium mit Gitterböden gehalten. An den Aluminiumkäfigen befanden sich spezielle Haltevorrichtungen für die gläsernen Futterflaschen, die oben geschlossen waren und auf der ganzen Länge eine Kalibrierung aufwiesen. Dadurch wurde eine Alkoholverdunstung verhindert und gleichzeitig war eine genaue Erfassung der täglich verbrauchten Futtermenge gewährleistet. Die Fütterung der Tiere erfolgte paarweise mit der Alkohol- bzw. Kontroll-Diät. Eine isokalorische Fütterung wurde dadurch erreicht, daß der Futterverbrauch des Alkohol-Tieres die Futtermenge der zugeordneten Kontroll-Ratte für den nächsten Tag bestimmte.
Um die Tiere allmählich an den Alkohol zu gewöhnen, erhielten sie in den ersten beiden Tagen der Fütterungsperiode eine Alkohol-Diät, die 3 g % Alkohol enthielt, am dritten und vierten Tag eine mit 4 g % und anschließend die übliche Alkohol-Diät, die 5 g % Alkohol aufwies.

2.5 Applikation von Dimethylnitrosamin

Die Untersuchungen wurden an insgesamt 96 Ratten durchgeführt, wobei die eine Hälfte die Alkohol-Diät, die andere die Kontroll-Diät erhielt. Die Fütterungsdauer betrug insgesamt drei Wochen. Anschließend bekamen die Tiere Altrumin-R-Trockenfutter sowie Leitungswasser ad libitum. Nach Umstellung der Diäten wurden verschiedene Tiergruppen gebildet. Die Hälfte der zuvor mit der Alkohol-Diät gefütterten Tiere erhielt Dimethylnitrosamin in einer täglichen Dosierung von 1 mg/100 g Körpergewicht in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung intraperitoneal injiziert, während bei der anderen Hälfte lediglich physiologische Kochsalzlösung appliziert wurde. In gleicher Weise wurde mit den mit Kontroll-Diät gefütterten Tieren verfahren. Die eine Hälfte erhielt Dimethylnitrosamin in der gleichen Dosierung wie die mit der Alkohol-Diät gefütterten Tiere, der anderen wurde lediglich physiologische Kochsalzlösung intraperitoneal appliziert. Wegen der erforderlichen Sicherheitsvorkehrungen erfolgte die Applikation des Dimethylnitrosamins und die anschließende Beobachtung der Tiere in speziell für diese Zwecke vorgesehenen Abzugsräumen des Fraunhofer-Instituts in Grafschaft/Schmallenberg.

Dimethylnitrosamin bzw. Kochsalz wurden unterschiedlich lang appliziert, nämlich einen, drei und fünf Tage. Die Applikation erfolgte jeweils um neun Uhr morgens und die Tötung der Tiere

vierundzwanzig Stunden nach der letzten Applikation durch Dekapitation. Zusätzlich wurden einige Tiere fünf Tage lang behandelt, jedoch erst vier Wochen nach der letzten Applikation getötet.

2.6 Materialaufarbeitung

Nach der Dekapitation der Tiere wurde das aus den Halsgefäßen austretende Blut in Reagenzglasern aufgefangen und nach etwa dreißig Minuten in der Zentrifuge bei vierhundert Umdrehungen pro Minute fünfzehn Minuten lang zentrifugiert. Das Serum wurde abpipettiert, tiefgefroren und bei -2o ^{o}C gelagert.

Nach Eröffnung der Bauchhöhle wurde ein etwa 0,5 Gramm schweres Leberstück aus dem größten Leberlappen entnommen, gewogen und in 4 %iges Formalin für die später erfolgende lichtmikroskopische Untersuchung eingelegt. Nach ausreichender Fixierung und Einbettung erfolgte dann die Farbung mit Hämatoxylin-Eosin. Die in situ verbliebene Leber wurde sorgfältig herauspräpariert, mit physiologischer Kochsalzlösung ein 25 %iges Leberhomogenat hergestellt und ebenfalls bei -20 ^{o}C eingefroren. Die Enzymbestimmungen im Serum und Leberhomogenat erfolgten innerhalb einer Woche.

2.7 Biochemische Bestimmungsmethoden

2.7.1 Glutamat-Dehydrogenase (GLDH)

Die Aktivitätsbestimmung der Glutamat-Dehydrogenase erfolgte nach der optimierten Standardmethode der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie. In Anwesenheit von GLDH reagiert -Ketoglutarat mit Ammoniumionen unter $NADH_2$-Verbrauch zu Glutamat und Wasser. Die Geschwindigkeit des $NADH_2$-Verbrauchs wurde durch die Extinktionsabnahme bei 366 nm gemessen. Sie ist der GLDH-Aktivität direkt proportional.

2.7.2 Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT)

Die GOT-Aktivität wurde nach der optimierten Standardmethode von Bergmeyer und Bernt bestimmt (3, 4).
Dabei läßt man das zu untersuchende Material in gepufferter Lösung auf L-Aspartat und -Ketoglutarat einwirken.
Durch die Enzymaktivität werden die Substanzen zu Oxalacetat und L-Glutamat umgesetzt. In Gegenwart von Malatdehydrogenase reagiert Oxalacetat unter $NADH_2$-Verbrauch zu Malat. Die Geschwindigkeit des $NADH_2$-Verbrauchs wurde durch die Extinktionsabnahme bei 366 nm gemessen. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte über den spezifischen Extinktionskoeffizient des NADH.

2.7.3 Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT)

Auch die Bestimmung der GPT-Aktivität erfolgte nach der optimierten Standardmethode von Bergmeyer und Bernt (3, 4). Das zu untersuchende Material läßt man auf L-Alanin und -Ketoglutarat einwirken. Durch die GPT-Aktivität werden die Reagentien zu Pyruvat und L-Glutamat umgesetzt. Katalysiert durch die Lactat-Dehydrogenase reagiert Pyruvat unter $NADH_2$-Verbrauch zu Lactat. Die Geschwindigkeit des $NADH_2$-Verbrauchs wurde durch die Extinktionsabnahme bei 366 nm gemessen. Die Berechnung der GPT-Aktivität erfolgte über den Extinktionskoeffizienten des NADH.

2.7.4 Alkalische Phosphatase (AP)

Die alkalische Phosphatase wurde mit der optimierten Standardmethode nach den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie 1970 und 1972 in Anlehnung an die Methode von Hausamen und Mitarbeiter 1967 bestimmt (12, 13, 21). Dabei wird p-Nitrophenyl-phosphat durch die Phosphatase in Phosphat und p-Nitrophenol gespalten. Die pro Zeiteinheit freigesetzte p-Nitrophenol-Menge wurde bei 405 nm bestimmt. Sie ist der Phosphatase-Aktivität proportional.

2.7.5 Glutathion

Die Glutathion-Bestimmung erfolgte nach der Methode von Mitchell et al. (29). Das 25 %ige Leberhomogenat wurde mit 4 %iger Sulfosalicylsäure enteiweißt und zentrifugiert. Bei Anwesenheit von Glutathion entstand nach Zusatz von 5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoesäure) zum eiweißfreien Überstand durch Disulfidbildung eine gelbe Farbe, deren Intensität mit dem Spektralphotometer Zeiss PM 4 bei 412 nm gemessen wurde. An einer zuvor angefertigten Standardkurve konnte die Glutathionmenge in µmol/g Leberfeuchtgewicht direkt abgelesen werden.

Außer bei der Glutathion-Bestimmung erfolgten alle Messungen bei 25 °C mit Hilfe des Zeiss Spektralphotometers PM 6. Die Enzymaktivitäten wurden in Units pro Liter Serum bzw. pro Gramm Leberfeuchtgewicht ausgedrückt und der Glutathiongehalt der Leber in µmol/g Leber wiedergegeben. Sämtliche Untersuchungen wurden als Doppelbestimmungen ausgeführt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen vom Mittelwert ($x \pm SEM$) errechneten sich aus den Einzeldaten. Die Mittelwertsdifferenzen wurden mit dem Gruppentest nach STUDENT analysiert und p-Werte $< 0{,}05$ als signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1 Serumenzyme

Während einer Dauer von drei Wochen wurden Ratten mit der Alkohol- bzw. Kontroll-Diät gefüttert und erhielten anschließend, in Gruppen aufgeteilt, einen, drei oder fünf Tage lang täglich 1 mg Dimethylnitrosamin in physiologischer Kochsalzlösung pro 100 g Körpergewicht bzw. lediglich physiologische Kochsalzlösung intraperitoneal appliziert. Die Tötung erfolgte jeweils 24 Stunden nach der letzten Applikation.

Nach Umstellen der Tiere von den beschriebenen Diäten auf Trockenfutter ergaben sich ohne DMN-Applikation nach einem Tag, sowie nach drei und fünf Tagen, nur geringe Aktivitätserhöhungen der Glutamat-Dehydrogenase im Serum bei den mit der Alkohol-Diät gefütterten Tieren im Vergleich zu den entsprechenden Kontroll-Tieren. Die Unterschiede waren allerdings nicht signifikant (Tab. 1). Nach einer einmaligen Gabe von Dimethylnitrosamin fand sich sowohl bei den mit der Alkohol-Diät gefütterten Tieren als auch bei den entsprechenden Kontroll-Tieren im Serum ein deutlicher Anstieg der Glutamat-Dehydrogenase-Aktivität im Vergleich zu den Tiergruppen, die kein Dimethylnitrosamin erhalten hatten. Eine einmalige Dimethylnitrosamin-Dosierung führte, verglichen mit

den Kontroll-Ratten, bei den mit Alkohol vorbehandelten Tieren zu einem geringen Anstieg der Glutamat-Dehydrogenase-Aktivität im Serum. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war nicht signifikant. Im Gegensatz dazu war die Glutamat-Dehydrogenase-Aktivität im Serum nach einer dreimaligen Dimethylnitrosamin-Applikation bei den mit der Kontroll-Diät gefütterten Ratten signifikant höher als bei den Alkohol-Tieren, die die gleiche Menge von Dimethylnitrosamin erhalten hatten (Tab. 1). Ähnliches gilt auch nach fünfmaliger Dimethylnitrosamin-Gabe. Diese Befunde zeigen, daß eine längere Vorbehandlung mit alkoholhaltigen Diäten vor einem stärkeren Aktivitätsanstieg der Glutamat-Dehydrogenase im Serum schützt, sofern Dimethylnitrosamin an mehreren Tagen appliziert wird. Bei einmaliger Dimethylnitrosamin-Applikation konnte ein protektiver Effekt jedoch nicht beobachtet werden.

Ohne Dimethylnitrosamin-Applikation führte im Vergleich zu den mit der Kontroll-Diät behandelten Tieren (Tab. 2) die mehrwöchige Vorbehandlung mit Alkohol-Diät nach Absetzen der Diäten, wenn überhaupt, dann nur zu geringen Aktivitätssteigerungen der GOT im Serum. Eine einmalige und auch dreimalige Dimethylnitrosamin-Applikation zeigte keinen deutlichen Aktivitätsanstieg der GOT im Serum bei den Alkohol-Tieren im Vergleich zu den entsprechenden Kontroll-Ratten. Erst eine fünfmalige Dimethylnitrosamin-Applikation bewirkte einen

signifikanten Anstieg der GOT-Serumaktivität bei den Kontroll-Tieren im Vergleich zu den mit der Alkohol-Diät vorbehandelten Ratten (Tab. 2). Ein protektiver Effekt der Alkoholvorbehandlung ergibt sich daher bei der GOT erst nach einer fünftägigen Dimethylnitrosamin-Behandlung.

Im Gegensatz zur GLDH- und GOT- steigt die GPT-Aktivitat im Serum nach einer einmaligen Dimethylnitrosamin-Applikation bei den mit der Alkohol-Diät vorbehandelten Tieren signifikant an, wenn im Vergleich dazu die mit Dimethylnitrosamin behandelten Ratten der Kontroll-Diät herangezogen werden (Tab. 3). Diese Steigerung der GPT-Serumaktivität bei den mit Alkohol vorbehandelten Tieren ließ sich jedoch nur bei einmaliger Dimethylnitrosamin-Applikation nachweisen. Die Alkohol-Tiere, die eine dreimalige Dimethylnitrosamin-Applikation erhalten hatten, wiesen eine solche Steigerung nicht auf (Tab. 3). Nach fünfmaliger Dimethylnitrosamin-Injektion war die GPT-Serumaktivität bei den mit der Kontroll-Diät gefütterten Tieren wesentlich stärker erhöht als bei den entsprechenden Alkohol-Tieren (Tab. 3). Diese Befunde zeigen, daß eine chronische Vorbehandlung mit Alkohol die GPT-Aktivität im Serum durch eine einmalige Dimethylnitrosamin-Gabe steigert, bei dreimaliger Applikation unverändert läßt und nach fünfmaliger Applikation zu einem signifikanten Aktivitätsabfall im Vergleich zu den ebenfalls mit Dimethylnitrosamin behandelten Kontroll-Tieren führt.

Die Untersuchung der alkalischen Phosphatase im Serum ergab, daß die Enzymaktivität bei den mit Alkohol-Diät vorbehandelten Ratten im Vergleich zu den entsprechenden Kontroll-Ratten noch mehrere Tage lang nach dem Umsetzen von den flüssigen Diäten auf Trockenkost erhöht blieb (Tab. 4). Eine erhöhte Serumaktivität der alkalischen Phosphatase ließ sich für die mit Alkohol vorbehandelte Gruppe auch dann zeigen, wenn Dimethylnitrosamin einen, drei oder fünf Tage appliziert worden war. Diese Befunde veranschaulichen, daß chronischer Alkoholkonsum per se die Serumaktivität der alkalischen Phosphatase erhöht, wobei eine weitere Steigerung durch Dimethylnitrosamin beobachtet werden kann. Ein protektiver Effekt einer chronischen Alkohol-Vorbehandlung auf die durch Dimethylnitrosamin verursachte Erhöhung der alkalischen Phosphatase im Serum konnte daher nicht bestätigt werden.

Bei den Tieren, die insgesamt fünf Tage lang Dimethylnitrosamin erhalten hatten und erst vier Wochen nach der letzten Applikation getötet worden waren, konnten, wenn überhaupt, dann nur geringe Unterschiede der einzelnen Serumenzym-Aktivitäten zwischen den Alkohol- und Kontroll-Gruppen nachgewiesen werden (Tab. 5).

Tab. 1

Aktivitätsänderung der Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) im Serum bei den mit Alkohol- bzw. Kontroll-Diät vorbehandelten Ratten in Abhängigkeit von verschieden langer Dimethylnitrosamin-Applikation. Die täglich applizierte Dosis betrug 1 mg DMN in physiologischer Kochsalzlösung pro 100 g Körpergewicht. Die entsprechenden Kontroll-Tiere erhielten lediglich physiologische Kochsalzlösung. Jede Gruppe bestand aus 6 Tieren. Die Tötung erfolgte 24 Stunden nach der letzten Applikation. Die Enzymaktivitäten sind in Units/l Serum angegeben.

Tag	DMN	Kontroll-Diät (U/l)	Alkohol-Diät (U/l)	p
1	-	4,27 ± 1,19	6,32 ± 1,03	NS
1	+	8,13 ± 1,45	10,18 ± 3,25	NS
3	-	4,82 ± 2,31	5,37 ± 1,94	NS
3	+	14,22 ± 2,90	7,97 ± 3,54	$<0,05$
5	-	7,03 ± 2,64	8,25 ± 1,84	NS
5	+	8,58 ± 1,51	5,55 ± 0,79	$<0,05$

Tab. 2

Aktivitätsänderung der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) im Serum. Die experimentellen Bedingungen sind in der Legende zu Tabelle 1 angegeben.

Tag	DMN	Kontroll-Diät (U/l)	Alkohol-Diät (U/l)	p
1	-	75,83 ± 3,67	110,17 ± 4,03	<0,0025
1	+	124,00 ± 8,22	136,17 ± 7,17	NS
3	-	106,35 ± 14,28	112,77 ± 7,05	NS
3	+	201,52 ± 11,52	181,20 ± 16,08	NS
5	-	112,02 ± 3,83	129,65 ± 4,65	<0,025
5	+	193,92 ± 10,49	115,63 ± 9,54	<0,0025

Tab. 3

Aktivitätsänderung der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) im Serum. Die experimentellen Bedingungen sind in der Legende zu Tabelle 1 angegeben.

Tag	DMN	Kontroll-Diät (U/l)	Alkohol-Diät (U/l)	p
1	-	37,65 ± 2,17	39,48 ± 1,55	NS
1	+	43,60 ± 3,77	61,85 ± 4,39	<0,05
3	-	43,75 ± 2,68	56,22 ± 3,73	<0,01
3	+	95,58 ± 3,60	83,27 ± 7,48	NS
5	-	40,73 ± 1,86	63,38 ± 1,93	<0,0005
5	+	105,47 ± 5,37	69,27 ± 6,51	<0,0025

Tab. 4

Aktivitätsänderung der alkalischen Phosphatase (AP) im Serum. Die experimentellen Bedingungen sind in der Legende zu Tabelle 1 angegeben.

Tag	DMN	Kontroll-Diät (U/l)	Alkohol-Diät (U/l)	p
1	-	143,57 ± 6,57	173,77 ± 12,32	<0,05
1	+	180,83 ± 8,36	253,32 ± 18,80	<0,05
3	-	122,08 ± 6,84	188,73 ± 6,52	<0,0005
3	+	273,92 ± 28,85	400,58 ± 33,25	<0,025
5	-	122,55 ± 2,88	153,58 ± 8,28	<0,01
5	+	215,17 ± 18,28	372,75 ± 45,20	<0,025

Tab. 5

Serumenzym-Aktivitäten der Alkohol- bzw. Kontroll-Tiere nach fünfmaliger Dimethylnitrosamin-Applikation. Bei diesen Tieren erfolgte die Tötung erst einen Monat nach der letzten Applikation. Die Enzym-Aktivitäten sind in Units/l Serum ausgedrückt. Die experimentellen Bedingungen entsprechen den in der Legende zu Tabelle 1 angegebenen.

Enzym	DMN	Kontroll-Diät (U/l)	Alkohol-Diät (U/l)	p
GLDH	-	5,46 ± 1,25	8,69 ± 0,71	<0,025
GLDH	+	12,83 ± 3,52	10,90 ± 1,06	NS
GOT	-	197,40 ± 13,84	255,31 ± 13,73	<0,025
GOT	+	218,81 ± 17,30	215,47 ± 54,66	NS
GPT	-	45,47 ± 3,31	55,03 ± 2,40	<0,0125
GPT	+	45,67 ± 2,77	51,93 ± 5,68	NS
AP	-	275,90 ± 24,36	293,96 ± 20,57	NS
AP	+	193,13 ± 44,03	297,37 ± 26,14	<0,025

3.2 Leberenzyme

Nach Absetzen der flüssigen Alkohol- und Kontroll-Diät fand sich bei den mit Alkohol vorbehandelten Tieren im Vergleich zu den entsprechenden Kontroll-Tieren, die beide nicht mit Dimethylnitrosamin behandelt worden waren, ein signifikanter Aktivitätsabfall der GLDH, GOT, GPT und AP in der Leber (Tab. 6 - 9). Dieser Aktivitätsabfall war für alle Enzyme am ersten Tag nach Absetzen der flüssigen Diäten festzustellen, am dritten bzw. fünften Tag jedoch nur noch für die GOT, GPT und AP, nicht aber für die GLDH.

24 Stunden nach einmaliger DMN-Applikation zeigten die mit der Kontroll-Diät vorbehandelten Versuchstiere im Vergleich zu den mit den Alkohol-Diäten vorbehandelten Ratten, die ebenfalls Dimethylnitrosamin erhalten hatten, signifikant höhere Aktivitäten aller vier Leberenzyme (Tab. 6 - 9). Nach drei- und fünfmaliger DMN-Injektion konnte bei der GLDH kein signifikanter Unterschied zwischen den Alkohol- und Kontroll-Gruppen beobachtet werden (Tab. 6). Die Leber-Aktivitäten der GOT und GPT waren dagegen nach drei- bzw. fünfmaliger DMN-Applikation bei den mit den Alkohol-Diäten vorbehandelten Ratten signifikant höher als bei den mit Kontroll-Diät gefütterten Tieren (Tab. 7 und 8). Dieser Befund steht im Gegensatz zu den Werten, die nach nur einmaliger DMN-Applikation für die Aktivität von beiden Leber-

enzymen nachgewiesen worden waren. Die Leberaktivitäten der alkalischen Phosphatase lagen auch nach drei- und fünftägiger DMN-Applikation bei den Kontroll-Ratten signifikant über denen der Alkohol-Tiere (Tab. 9).

Tab. 6

Aktivitätsänderung der Glutamat-Dehydrogenase (GLDH) in der Leber. Die experimentellen Bedingungen sind in der Legende zu Tabelle 1 angegeben. Die Aktivität wird in Units/g Leberfeuchtgewicht ausgedrückt.

Tag	DMN	Kontroll-Diät (U/g)	Alkohol-Diät (U/g)	p
1	-	256,1 ± 11,4	232,6 ± 5,8	0,025
1	+	222,0 ± 13,3	176,5 ± 11,5	0,05
3	-	230,2 ± 24,2	223,6 ± 12,3	NS
3	+	169,0 ± 14,9	177,6 ± 7,8	NS
5	-	319,1 ± 13,2	306,8 ± 23,6	NS
5	+	222,2 ± 11,2	210,2 ± 16,3	NS

Tab. 7

Aktivitätsänderung der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) in der Leber. Die experimentellen Bedingungen sind in der Legende zu Tabelle 1 angegeben. Die Aktivität wird in Units/g Leberfeuchtgewicht ausgedrückt.

Tag	DMN	Kontroll-Diät (U/g)	Alkohol-Diät (U/g)	p
1	-	238,0 ± 3,7	208,2 ± 3,6	<0,0005
1	+	173,3 ± 2,7	121,6 ± 4,1	<0,0005
3	-	205,6 ± 4,3	148,8 ± 4,9	<0,0005
3	+	99,2 ± 2,1	129,6 ± 2,6	<0,0025
5	-	185,2 ± 2,8	149,3 ± 4,6	<0,0005
5	+	77,3 ± 1,8	107,4 ± 2,5	<0,0005

Tab. 8

Aktivitätsänderung der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) in der Leber. Die experimentellen Bedingungen sind in der Legende zu Tabelle 1 angegeben. Die Aktivität wird in Units/g Leberfeuchtgewicht ausgedrückt.

Tag	DMN	Kontroll-Diät (U/g)	Alkohol-Diät (U/g)	p
1	-	65,3 ± 0,9	58,1 ± 0,7	<0,0005
1	+	46,5 ± 1,7	34,2 ± 0,8	<0,0005
3	-	59,9 ± 0,8	40,6 ± 0,9	<0,0005
3	+	22,2 ± 0,6	28,3 ± 0,2	<0,0005
5	-	56,2 ± 0,9	40,1 ± 0,8	<0,0005
5	+	14,9 ± 0,5	27,8 ± 4,5	<0,025

Tab. 9

Aktivitätsänderung der alkalischen Phosphatase (AP) in der Leber. Die experimentellen Bedingungen sind in der Legende zu Tabelle 1 angegeben. Die Aktivität wird in Units/g Leberfeuchtgewicht ausgedrückt.

Tag	DMN	Kontroll-Diät (U/g)	Alkohol-Diät (U/g)	p
1	-	1,7 ± 0,03	1,3 ± 0,05	<0,0005
1	+	1,0 ± 0,03	0,7 ± 0,03	<0,0005
3	-	1,7 ± 0,04	1,3 ± 0,04	<0,0005
3	+	0,8 ± 0,03	0,4 ± 0,02	<0,0005
5	-	0,9 ± 0,04	1,4 ± 0,04	<0,0005
5	+	0,8 ± 0,03	0,6 ± 0,03	<0,0025

3.3 Glutathion

Am ersten Tag nach Absetzen der flüssigen Diaten bestand im Leberhomogenat kein deutlicher Unterschied des Glutathion-Gehaltes zwischen den mit Alkohol- bzw. Kontroll-Diat vorbehandelten Gruppen, gleichgültig ob Dimethylnitrosamin appliziert worden war oder nicht (Tab. 10). Nach drei- und funfmaliger Gabe von Dimethylnitrosamin fand sich im Vergleich zu den Kontroll-Tieren bei den mit Alkohol vorbehandelten Tieren ein signifikanter Anstieg des Glutathion-Gehaltes in der Leber (Tab. 10).

Tab. 10

Anderung des Glutathion-Gehaltes in der Leber bei den mit Alkohol- bzw. Kontroll-Diat vorbehandelten Ratten in Abhängigkeit von verschieden langer Dimethylnitrosamin-Applikation. Die experimentellen Bedingungen sind in der Legende zu Tabelle 1 angegeben. Die Glutathionmenge ist in umol/g Leberfeuchtgewicht ausgedrückt.

Tag	DMN	Kontroll-Diät (µmol/g)	Alkohol-Diät (µmol/g)	p
1	-	5,30 ± 0,07	5,02 ± 0,18	NS
1	+	4,74 ± 0,21	4,62 ± 0,23	NS
3	-	6,51 ± 0,09	5,59 ± 0,17	< 0,005
3	+	5,27 ± 0,30	6,49 ± 0,10	< 0,005
5	-	6,17 ± 0,09	4,44 ± 0,11	< 0,0005
5	+	4,06 ± 0,21	5,03 ± 0,16	< 0,001

3.4 Histologische Befunde

1. Gruppe der einmalig mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten Alkohol-Tiere

Diese Tiere hatten nach dreiwöchiger Alkohol-Fütterung statt DMN physiologische Kochsalzlösung intraperitoneal erhalten. Histologisch zeigt sich in sämtlichen Lebern ein regelmäßiger Läppchenaufbau mit radiär auf die Zentralvenen ausgerichteten Leberzellplatten. Die Portalfelder sind klein und scharf begrenzt, entzündliche Infiltrate fehlen. Das Zytoplasma der Leberzellen ist ganz überwiegend hydropisch geschwollen, gelegentlich erkennt man eine peribiliäre Basophilie des Zytoplasmas. Einzelne Leberzellen schließen große Fett-Tropfen ein mit Betonung in der Läppchenperipherie. Nekrosen oder hyaline Zelleinschlüsse (Mallory Körperchen) wurden nicht beobachtet.

2. Gruppe der einmalig mit Dimethylnitrosamin behandelten Alkohol-Tiere

Diese Tiere hatten nach dreiwöchiger Alkoholfütterung eine einmalige Dosis von DMN intraperitoneal appliziert bekommen. Der Läppchenaufbau ist auch hier gewahrt. Einige perizentrale Sinusoide sind leicht erweitert. Läppchenperipher zeigen die Leberzellen eine zum Teil deutliche hydropische Schwellung des Zytoplasmas, gelegentlich wird die Hälfte der Läppchen von derartig ver-

änderten Zellen eingenommen. In diesen läßt sich überwiegend eine angedeutete peribiliäre Basophilie nachweisen. In den Läppchenzentren erscheint das Plasma der Hepatocyten fein granulär und blaß eosinophil. Frische Einzellnekrosen von Hepatocyten waren nur vereinzelt nachweisbar (Abb. 1).

3. Gruppe der einmalig mit Dimethylnitrosamin behandelten Kontroll-Tiere

Diese Tiere hatten nach dreiwöchiger Kontroll-Diät eine einmalige Dosis von DMN appliziert bekommen. Hier erkennt man in der Läppchenperipherie nur eine leichte Schwellung des Zytoplasmas der Leberzellen. In den perizentralen Leberzellen ist das Plasma fein granulär gestaltet und leicht eosiophil gefärbt. Einzelne kleine Lücken im Verband der Leberzellen weisen auf bereits abgeräumte Leberzellnekrosen hin. Verglichen mit der entsprechenden Alkoholgruppe fällt eine deutlich geringere hydropische Schwellung der Hepatocyten auf (Abb. 2).

4. Gruppe der dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten Alkohol-Tiere

Diese Tiere hatten nach dreiwöchiger Alkohol-Vorfütterung drei Injektionen physiologische Kochsalzlösung intraperitoneal erhalten. Im Vergleich zu den Ratten, die nach dreiwöchiger Alkohol-Diät nur eine Kochsalzinjektion erhalten

hatten, war die Schwellung der Hepatocyten in der Läppchenperipherie zurückgegangen. Gelegentlich fiel in den peripheren Hepatocyten ein basophiles scholliges Zytoplasma auf.

5. Gruppe der dreimal mit Dimethylnitrosamin behandelten Alkohol-Tiere

Diese Tiere hatten nach dreiwöchiger Alkohol-Diät an drei aufeinanderfolgenden Tagen DMN intraperitoneal appliziert bekommen. Der Läppchenaufbau bleibt erhalten, die perizentralen Sinusoide sind jedoch überwiegend erweitert und hyperämisch, die Leberzellplatten entsprechend deutlich verschmälert. Gelegentlich kommen kleine Lücken im Verband der Leberzellen als Hinweis auf bereits abgeräumte kleine Leberzellnekrosen vor. Im Bereich der Lücken sind einige pigmentspeichernde Makrophagen nachweisbar. In der Läppchenperipherie erscheinen die Hepatocyten zum Teil wiederum deutlich hydropisch geschwollen, einige lassen ein perinukleäres, gobscholliges, basophiles Zytoplasma erkennen. Die läppchenzentralen Hepatocyten sind eosinophil, ihre Kerne zum Teil pyknotisch. Einzellnekrosen waren nur selten nachweisbar, Gruppennekrosen fehlten. Ein eindeutiger Unterschied im Schweregrad der Leberzellschädigung zwischen dieser Gruppe und den Alkohol-Tieren, denen einmalig DMN verabreicht worden war, war nicht nachweisbar.

6. Gruppe der dreimal mit Dimethylnitrosamin behandelten Kontroll-Tiere

Diesen Tieren war nach dreiwöchiger Kontroll-Diat dreimal DMN injiziert worden. Die Sinusoide sind zum Teil deutlich erweitert und hyperämisch, die Leberzellplatten entsprechend verschmälert und zum Teil auch unterbrochen als Ausdruck bereits abgeräumter umschriebener Leberzellnekrosen. In einigen Läppchenzentren finden sich peliosisartige Defekte der Leberzellplatten. Herdförmig kommen hier einige Makrophagen vor. Die hydropische Schwellung der Hepatocyten in der Läppchenperipherie ist nur geringfügig ausgeprägt. Gelegentlich sind disseminiert angeordnete Councilman-Körperchen erkennbar. Im Vergleich zu den Tieren, die nach Alkohol-Diät drei DMN-Injektionen erhalten hatten, ist die Rarefizierung der Leberzellplatten als Hinweis auf abgelaufene Nekrosen ausgeprägter, während das Ausmaß der hydropischen Zytoplasmaschwellung in der Leberzellperipherie geringer ist.

7. Gruppe der fünfmal mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten Alkohol-Tiere

Diese Ratten hatten nach dreiwöchiger Alkoholbehandlung fünf Injektionen physiologische Kochsalzlösung erhalten. Die läppchenzentralen Hepatocyten lassen eine angedeutete feine Granulierung des Zytoplasmas erkennen. In der Läppchenperipherie ist das Zytoplasma in wechselndem Umfang

hydropisch geschwollen. Eine nennenswerte Verfettung liegt nicht vor. Nur ganz vereinzelt waren Councilman-Körperchen nachweisbar.

8. Gruppe der fünfmal mit Dimethylnitrosamin behandelten Alkohol-Tiere

Den Tieren dieser Gruppe war nach Absetzen der Alkohol-Diät an fünf aufeinanderfolgenden Tagen Dimethylnitrosamin verabreicht worden. Die läppchenzentralen Sinusoide sind zum Teil etwas erweitert und hyperämisch, peliosisartige Epitheldefekte kommen jedoch nicht vor. Gelegentlich können jedoch auch hier kleine Lücken in den Leberzellplatten als Ausdruck von abgeräumten Nekrosen nachgewiesen werden. In der Läppchenperipherie zeigt nur ein Teil der Hepatocyten eine hydropische Schwellung bei leicht basophilem Zytoplasma. Einige Leberzellen enthalten kleine Fett-Tropfen (Abb. 3).

9. Gruppe der fünfmal mit Dimethylnitrosamin behandelten Kontroll-Tiere

Diesen Tieren war nach dreiwöchiger Kontroll-Diät fünf Tage lang DMN appliziert worden. Hier kommt eine deutliche Erweiterung der läppchenzentralen Sinusoide mit entsprechender Verschmälerung der Leberzellplatten und deutlicher Anschoppung von Erythrocyten in den Sinusoiden zum Ausdruck. In einigen Läppchenzentren sind peliosis-

artige Hohlräume entstanden. Frische Leberzellnekrosen kommen jedoch nicht vor. Die läppchenperipheren Leberzellen sind zum Teil leicht hydropisch geschwollen, ihr Zytoplasma läßt eine geringe Basophilie erkennen. Darüber hinaus besteht eine geringe läppchenperiphere kleintropfige Verfettung. Auch finden sich Mitosen von Leberzellen.
Im Vergleich zu den Alkohol-Tieren, die fünfmal DMN appliziert bekommen hatten, ist die Schädigung hier deutlich schwerer ausgeprägt (Abb. 4).

10. Gruppe der weder mit Dimethylnitrosamin noch mit Alkohol vorbehandelten Tiere

Bei diesen Tieren, denen nach dreiwöchiger Kontroll-Diät-Fütterung ein-, drei- bzw. fünfmal physiologische Kochsalzlösung appliziert worden war, ergaben sich keine wesentlichen pathologischen Befunde.

Anhand der histologischen Veränderungen in der Leber ergibt sich daher folgende Reihenfolge im Schweregrad der Leberschädigung (Reihenfolge von geringster bis schwerster Schädigung):

- Kontroll-Tiere nach einmaliger DMN-Applikation
- Alkohol-Tiere nach einmaliger DMN-Applikation
- Alkohol-Tiere nach dreimaliger DMN-Applikation
- Kontroll-Tiere nach dreimaliger DMN-Applikation
- Alkohol-Tiere nach fünfmaliger DMN-Applikation
- Kontroll-Tiere nach fünfmaliger DMN-Applikation

Abb. 1 Leberhistologie eines einmalig mit Dimethylnitrosamin behandelten Alkohol-Tieres (12,5fache Vergrößerung)

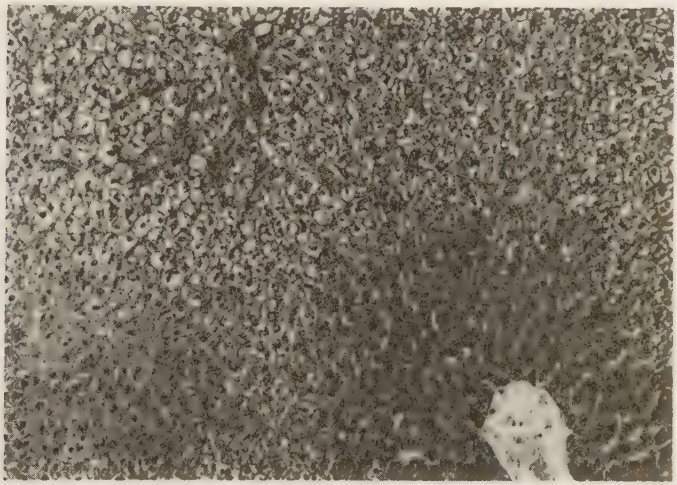


Abb. 2 Leberhistologie eines einmalig mit Dimethylnitrosamin behandelten Kontroll-Tieres (12,5fache Vergrößerung)

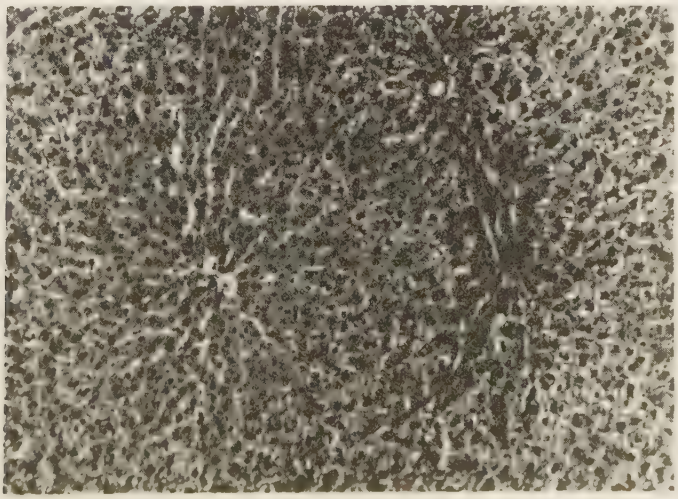
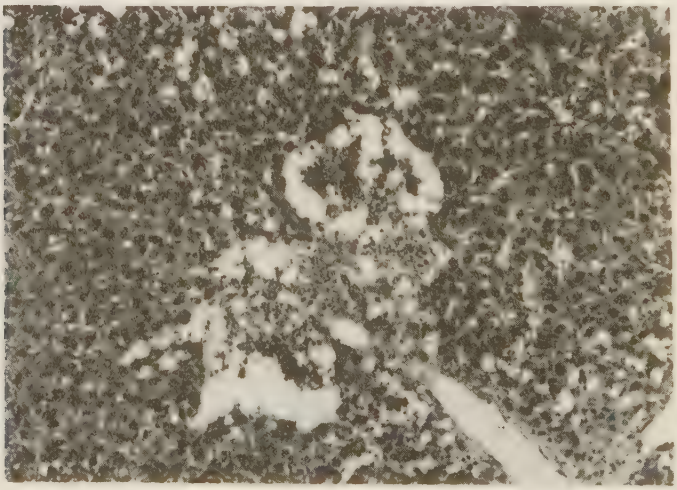


Abb. 3 Leberhistologie eines fünfmal mit Dimethylnitrosamin behandelten Alkohol-Tieres (12,5fache Vergrößerung)

Abb. 4 Leberhistologie eines fünfmal mit Dimethylnitrosamin behandelten Kontroll-Tieres (12,5fache Vergrößerung)



4. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluß einer längeren Vorbehandlung mit Alkohol auf die Leberschädigung durch Dimethylnitrosamin untersucht. Als Parameter der Hepatoxizität wurden enzymatische und histologische Kriterien herangezogen. Die Ergebnisse der Studie zeigen, daß nach einer fünfmaligen Dimethylnitrosamin-Applikation die Zeichen der Leberzellschädigung bei den mit Alkohol vorbehandelten Tieren wesentlich geringer sind als bei den mit der Kontroll-Diät gefütterten Tieren, die die gleiche Menge Dimethylnitrosamin erhalten hatten. Im Gegensatz dazu fand sich bei einer einmaligen Applikation von Dimethylnitrosamin kein protektiver Effekt durch eine längerfristige Vorbehandlung mit Alkohol.

Der protektive Effekt einer chronischen Alkohol-Vorbehandlung auf die Leberzellschädigung nach fünfmaliger Dimethylnitrosamin-Applikation konnte nicht nur histologisch (Abb. 1 - 4) sondern auch enzymatisch (Tab. 1 - 3) nachgewiesen werden. So waren nach fünfmaliger Dimethylnitrosamin-Applikation die Serumaktivitäten der GLDH, GOT und GPT bei den mit der Alkohol-Diät vorbehandelten Tieren signifikant niedriger als bei den entsprechenden Kontroll-Tieren (Tab. 1 - 3). Infolge des gesteigerten Enzymaustritts aus den Leberzellen fand sich nach fünfmaliger Dimethylnitrosamin-Applikation bei der mit der Kontroll-Diät vorbehandelten

Gruppe im Vergleich zu den entsprechenden Alkohol-Tieren ein signifikanter Aktivitätsabfall der GOT und GPT in der Leber (Tab. 7 und 8). Entsprechendes gilt auch für den Glutathion-Gehalt der Leber (Tab. 10).

Die akute hepatotoxische Wirkung von Dimethylnitrosamin wurde sowohl histopathologisch als auch enzymatisch in Tierversuchen von verschiedenen Autoren untersucht (2, 36). Danach werden innerhalb von 24 bis 48 Stunden nach Dimethylnitrosamin-Applikation zentrilobuläre Nekrosen sowie Blutungen in der Leber beschrieben. Als Zeichen der Lebertoxizität fanden sich auch sogenannte "Blutzysten" und Nekrosen des Endothels von Zentral- und Sublobulärvenen mit Ausstoßung von nekrotischem Material in das Lumen (25). Sofern die Tiere die ersten fünf bis sechs Tage überlebt hatten, konnte eine Restitutio ad intergrum innerhalb von drei Wochen beobachtet werden (36).

In einer Kurzzeitstudie zur Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen oraler Dimethylnitrosamin-Applikation und Hepatotoxizität war histopathologisch bei allen Tieren eine Läppchenvergrößerung sowie Vakuolisierung der Hepatocyten festgestellt worden (14). Bei den mit einer höheren Dimethylnitrosamin-Dosierung behandelten Tieren traten auch subkutane Ödeme und Aszites auf. Außerdem wird eine Erhöhung der GPT-Aktivität im Serum beschrieben (14). In Versuchen

von Magee und Barnes (2) zur Toxizität von Dimethylnitrosamin konnten beträchtliche Unterschiede im zytologischen Bereich im Vergleich zu Normallebern festgestellt werden. Die mit Dimethylnitrosamin behandelten Tiere zeigten generell eine Zellvergrößerung mit großen Kernen und Nukleolen. Diese bei Versuchstieren durch Dimethylnitrosamin hervorgerufene Leberschädigung konnte auch beim Menschen nachgewiesen werden (36).

Bereits 1954 vermuteten Dutton und Heath (10, 27), daß als eigentliche toxische Substanz ein in der Leberzelle gebildeter Metabolit des Dimethylnitrosamins anzusehen ist. 1961 fanden Druckrey und Mitarbeiter (8) als ersten Schritt des DMN-Metabolismus eine -C-Hydroxilierung. Das -Hydroxidimethylnitrosamin wird dann unter Abspaltung von Formaldehyd zum Monomethylnitrosamin dealkyliert (5, 30). Für diesen Schritt wird eine N-Demethylase und das Redoxsystem des NADPH benötigt. Das entstandene Monomethylnitrosamin ist außerordentlich instabil und zerfällt unter Wasserabspaltung zu Diazomethyl (31). In wäßrigem Medium entsteht bei Anwesenheit von Wasserstoffionen dann über das Methyldiazonium-Ion das direkt alkylierend wirkende Carbonium-Ion. Dieser Abbauweg wurde von Smith et al. (38) im Jahre 1979 bestätigt. Es wurde postuliert, daß das Carbonium-Ion als direkt methylierende Substanz aktiv ist und die eigentliche schädigende Wirkform des Dimethylnitrosamins darstellt (9).

Wenn der Dimethylnitrosamin-Abbau einer "Giftung" gleichkommt, so kann die nach chronischem Alkoholkonsum beobachtete geringere Leberzellschädigung infolge mehrmaliger Dimethylnitrosamin-Applikation am ehesten durch eine Verzögerung des Metabolismus erklärt werden. Der auslösende Schritt des Dimethylnitrosamin-Abbaus ist die Dealkylierung und wird durch die Dimethylnitrosamin-Demethylase katalysiert. Dieses Enzym ist im endoplasmatischen Reticulum der Leberzelle lokalisiert und gehört zur Gruppe der mischfunktionellen Oxidasen (22). Eine Beeinflussung der Dimethylnitrosamin-Demethylase durch Phenobarbital, polychloriertes Diphenyl sowie 3-Methylcholanthren wurde von verschiedenen Autoren beschrieben (19, 23).

Arcos und Mitarbeiter (1) konnten die Existenz von zwei verschiedenen Formen der Dimethylnitrosamin-Demethylase nachweisen, die bei zwei verschiedenen Substratkonzentrationen aktiv waren. Die Demethylase I zeigt ein Aktivitätsmaximum bei Dimethylnitrosamin-Konzentrationen bis zu 4 mMol und wird durch Substanzen wie Aroclor, Phenobarbital und 3-Methylcholanthren reprimiert. Im Gegensatz dazu zeigt die Demethylase II ein Aktivitätsmaximum bei Substratkonzentrationen von 50 bis 200 mMol und wird von Substanzen wie Aroclor, Phenobarbital und 3-Methylcholanthren induziert. Die früher zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse wurden von Arcos auf die jeweils unterschiedlichen Substratkonzentrationen zurückgeführt.

Chronischer Alkoholkonsum bei Ratten führt zu einem signifikanten Aktivitätsanstieg der mikrosomalen Dimethylnitrosamin-Demethylase in der Leber (37). Dieser Effekt von Alkohol auf die Dimethylnitrosamin-Demethylase war in vitro sowohl bei niedrigen Dimethylnitrosamin-Konzentrationen bis 1 mMol als auch bei höheren Konzentrationen von 100 mMol Dimethylnitrosamin nachweisbar. Der Anstieg der Dimethylnitrosamin-Demethylase nach chronischem Alkoholkonsum (37) kann die allerdings nur geringe Steigerung der Leberschädigung nach einer einmaligen Dimethylnitrosamin-Applikation bei den mit Alkohol gefütterten Tieren erklären (Tab. 1 - 4 und 6 - 9, Abb. 1 und 2).

Eine gesteigerte Toxizität nach chronischem Alkoholkonsum war früher auch nach einer einmaligen Gabe von Tetrachlorkohlenstoff (20), Paracetamol (39) und Chlorpromazin (46) nachgewiesen worden. Bei all diesen Substanzen wird die gesteigerte Hepatoxizität auf eine vermehrte Bildung toxischer Abbauprodukte zurückgeführt.

Von besonderem Interesse war der Befund in der gegenwärtigen Studie, daß im Gegensatz zu einer einmaligen Dimethylnitrosamin-Applikation eine fünfmalige Gabe bei den mit Alkohol vorbehandelten Tieren eine wesentlich geringere Leberschädigung als bei den Kontroll-Tieren bewirkte (Tab. 1 - 3, 7 und 8, Abb. 3 und 4). Der Mechanismus dieser protektiven Wirkung ist noch nicht geklärt. Es ist möglich, daß eine mehrfache Dimethylnitrosamin-

Applikation bei den mit Alkohol vorbehandelten Tieren zu einer wesentlich stärkeren Reduktion der Dimethylnitrosamin-Demethylase führt und somit den Metabolismus von Dimethylnitrosamin zu toxischen Abbauprodukten verringert.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden tierexperimentellen Studie sollte die Frage geklärt werden, in wie weit sich die Leberschädigung infolge Dimethylnitrosamin nach chronischem Alkoholkonsum ändert. Weibliche Sprague-Dawley Ratten wurden daher drei Wochen lang gruppenweise mit ernährungsmäßig vollwertigen Flüssigdiäten gefüttert, die entweder Alkohol oder isokalorisch Kohlenhydrate enthielten. Einem Teil der Tiere wurde an einem, drei oder fünf Tagen je 1 mg Dimethylnitrosamin pro kg Körpergewicht pro Tag appliziert, während die entsprechenden Kontrollen physiologische Kochsalzlösung in äquivalenter Menge erhielten. Die Tötung der Tiere erfolgte jeweils 24 Stunden nach der letzten Applikation. Enzymatisch zeigten die mit Alkohol vorbehandelten Tiere nach fünffacher Dimethylnitrosamin-Applikation geringere Zeichen der Leberzellschädigung als die entsprechenden Kontroll-Tiere, die die gleiche Menge Dimethylnitrosamin erhalten hatten. So fanden sich bei den mit Alkohol vorbehandelten Tieren wesentlich geringere Serumaktivitäten der GLDH, GOT und GPT im Vergleich zu den Kontroll-Ratten. Ähnliche Resultate ergaben sich auch für den Glutathion-Gehalt der Leber. Diese Beobachtungen decken sich mit den histologischen Ergebnissen, die bei den Kontroll-Tieren

nach fünfmaliger Dimethylnitrosamin-Injektion große peliosisartige Hohlräume in den Läppchenzentren mit deutlicher Hyperämie der zentralen Sinusoide zeigten, während diese Schädigungszeichen bei den Alkohol-Tieren in weitaus geringerem Maße auftraten. Die Verringerung der Leberzellschädigung nach mehrmaliger Dimethylnitrosamin-Applikation bei den mit Alkohol vorbehandelten Tieren kann am ehesten auf eine Aktivitätsverringerung der mikrosomalen Dimethylnitrosamin-Demethylase in der Leber zurückgeführt werden. Daraus folgt eine geringere Bildung hepatotoxischer Abbauprodukte. Im Gegensatz dazu konnte nach einer einmaligen Dimethylnitrosamin-Applikation ein Trend zu einer gesteigerten Hepatotoxizität nach chronischem Alkoholkonsum gezeigt werden. Dieser dürfte mit der zu diesem Zeitpunkt nachweisbaren Aktivitätssteigerung der Dimethylnitrosamin-Demethylase zusammenhängen.

6. Literaturverzeichnis

1. Arcos, J.C., Davies, D.L., Brown, Ch.E.L., Argus, M.F.
Repressible and inducible enzymic forms of dimethylnitrosamine-demethylase.
Z. Krebsforsch. 89, 181 - 199 (1977)

2. Barnes, J.M., Magee, P.N.
Some toxic properties of dimethylnitrosamine.
Br. J. Ind. Med. 11, 167 - 174 (1954)

3. Bergmeyer, H.U., Bernt, E.
Glutamat-Pyruvat-Transaminase, in: Bergmeyer: Methoden der enzymatischen Analyse
Verlag Chemie, Weinheim 717 - 723 (1970)

4. Bergmeyer, H.U., Bernt, E.
Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
in: Bergmeyer: Methoden der enzymatischen Analyse
Verlag Chemie, Weinheim 769 - 775 (1974)

5. Brouwers, J.A.J., Emmelot, P.
Microsomal N-demethylation and the effect of the hepatic carcinogen dimethylnitrosamine on amino acid incorporation into the proteins of rat liver and hepatomas.
Exp. Cell Res. 19, 467 (1960)

6. Crosby, N.T., and M.A.
Estimation of steam-volatile N-nitrosamines in food at the 1 µg/kg level.
Nature 238, 342 (1972)

7. DeCarli, L.M., Lieber, C.S.
Fatty liver in the rat after prolonged intake of ethanol with a nutritionally adequate new liquid diet.
J. Nutr. 91, 331 - 336 (1967)

8. Druckrey, H., Preussmann, R., Ivancovic, S., Müller, M.
Chemische Konstitution und karzinogene Wirkung bei Nitrosaminen.
Naturwissenschaften 48, 134 (1961 a)

9. Druckrey, H., Preussmann, R., Ivancovic, S., Schmähl, D.
Organotrope karzinogene Wirkung bei 65 verschiedenen N-Nitroso-Verbindungen an BD-Ratten.
Zeitschrift für Krebsforschung 69, 103 - 201 (1967)

10. Dutton, A.H., Heath, D.F.
Demethylation of dimethylnitrosamine in rats and mice.
Nature 178, 644 (1956 b)

11. Eisenbrand, G., Eisenbrand, M.A.
Abstract 4th IARC, Meeting of Annal. and Formation of N-nitroso-compounds, Tallinn. Oct. 1975
IARC Sci. Publ. (im Druck)

12. Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie
Standardisierung von Methoden zur Bestimmung von Enzymaktivitäten in biologischen Flüssigkeiten.
Z. Klin. Che. Klin. Biochem. 8, 658 - 660 (1970)

13. Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie
Standardisierung von Methoden zur Bestimmung von Enzymaktivitäten in biologischen Flüssigkeiten. Experimentelle Begründung der optimierten Standard-Bedingungen.
Z. Klin. Che. Klin. Biochem. 10, 182 - 192 (1972)

14. EPA (Environment Protecting Agency)
Scientific and technical assessment report on nitrosamines.
EPA-600/6-77-001, Washington, p. 210 (1976)

15. Fazio, T. and M.A.
Agr. Food. Chem. 10, 250 (1971)

16. Fine, D.H., Rounbehler, D.P.
N-nitroso-compounds in water in identification on analysis of organic pollutants in water. Keith, L.H., ed. Ann Arbor Science, Michigan (1976)

17. Fine, D.H. et al.
Human exposure to pre-formed N-nitroso-compounds in the environment.
in: Hiatt, H.H., Watson, J.D., Winsten, J.D. eds. Cold Spring Harbor Conference on Cell Proliferation Vol. 4 Origins of Human Cancer N.Y. pp. 293 - 307 (1977)

18. Fine, D.H. (in press)
An assessment of human exposure to N-nitroso-compounds.
Presented before the 5th IARC Meeting, Durham, N.H., August 1977

19. Frantz, C.N., Malling, H.V.
Factors affecting metabolism and mutagenicity of dimethylnitrosamine and diethylnitrosamine. Cancer Res. 35, 2307 - 2314 (1975)

20. Hasumura, Y., Teschke, R., Lieber, C.S.
Increased carbon tetrachloride hepatotoxicity and its mechanism after chronic ethanol consumption.
Gastroenterology 66, 415 - 422 (1974)

21. Hausamen, T.U., Helger, R., Rick, W., Gross, W.
Optimal conditions for the determination of serum alkaline phosphatase by a new kinetic method.
Clin. Chim. Acta 15, 241 - 245 (1967)

22. Lai, D.Y., Myers, S.C., Yin-Tak Woo
Role of dimethylnitrosamine-demethylase in the metabolic activation of dimethylnitrosamine.
Chem.-Biol. Interactions, 28, 107 - 126 (1979)

23. Lake, B.G., Heading, L.E., Phillips, J.C., Gangolli, S.D.
Studies on the effects of phenobarbitone and 20-methylcholanthrene pretreatment on the metabolism and toxicity of dimethylnitrosamine in the rat.
Biochem. Soc. Trans. 2, 882 - 885 (1974 b)

24. Lijinski, W., Epstein, S.S.
Nitrosamines as environmental carcinogens.
Nature 225, 21 - 23 (1970)

25. Maddock, J.T., Byer, W.L., Malseed, R.T., Katz, A.
Nitrosamines
Auerbach Associates, Inc., Philadelphia, Pa

26. Magee, P.N., Barnes, J.M.
The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine.
Brit. J. Cancer 10, 114 (1956)

27. Magee, P.N., Barnes, J.M.
Carcinogenic nitroso compounds.
Adv. Cancer Res. 10, 164 (1967)

28. Mclean, E., Bras, G., Mclean, A.E.M.
Venous occlusions in the liver following dimethylnitrosamine.
Br. J. Exptl. Path. 46, 367 - 369 (1965)

29. Mitchell, J.R., Jollow, D.J., Potter, W.Z., Gillette, J.R.
Acetaminophen-induced hepatic necrosis. A protective role of glutathione.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 187, 211 - 217 (1973)

30. Mizrahi, I., Emmelot, P.
The effect of cystein on the metabolic changes produced by two carcinogenic N-nitroso-dialkylnitrosamines in rat liver.
Cancer Res. 22, 339 (1962)

31. Müller, E., Haiss, R., Rundel, W.,
Über das Kaliummethyldiazotat, ein "stabilisiertes Diazomethan" und das Monomethylnitrosamin.
Chem. Bev. 93, 1541 (1960)

32. Nayak, N.C., Chopra, P., Dhar, A.
Diverse mechanisms of hepatocellular injuries due to chemicals: Evidence in rats administered carbon tetrachloride or dimethylnitrosamine.
Br. J. Exp. Path. 56, 103 - 112 (1975)

33. Popper, H., Cygan, P., Grein, H.
Mutagenicity of primary and secondary carcinogens altered by normal and induced hepatic microsomes.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 145, 727 - 729 (1973)

34. Scanlan, R.A.
N-nitrosamines in foods.
CRC critical Reciews in Food Technology 5, 357 - 402 (1975)

35. Sen, N.P.
Food Cosmetic Toxicol. 10, 219 (1972)

36. Shank, R.C.
Toxicology of N-nitroso-compounds
Toxicol. Appl. Phar. 31, 361 - 368 (1975)

37. Sipes, G., Slocumb, M.L., Holtzman, G.
Stimulation of microsomal dimethylnitrosamine-demethylase by pretreatment of mice with N-acetone.
Chem.-Biol. Interactions 21, 155 - 166 (1978)

38. Smith, D.L., Knight, R.C., Magee, P.N.
DNA methylation during oxidative dealkylation of dimethylnitrosamine (DMN) by liver microsomes.
Proc. Am. Ass. Cancer Res. 20, 12th (1979)

39. Teschke, R., Stutz, G., Strohmeyer, G.
Increased paracetamol-induced hepatotoxicity after chronic alcohol consumption.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 91, 368 - 374 (1979)

40. Teschke, R., Stutz., Moreno, F.
Cholestases following chronic alcohol consumption: Enhancement after an acute dose of chlorpromazin.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 94, 1013 - 1020 (1980)

41. Wassermann, A.E., Wassermann, M.A.
Food Cosmetic Toxicol. 10, 681 (1972)

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Privat-Dozent Dr. R. Teschke für die Überlassung des Themas, die jederzeit gewährte Unterstützung sowie die wertvollen Anregungen bei der Durchführung der Arbeit;

Herrn Prof. Dr. H. Frenzel für die stets bereitwillig gewährte Hilfe bei der Beurteilung der histologischen Untersuchungen;

Herrn Dr. H. J. Bieniek für die Überlassung des Arbeitsplatzes in der Tierversuchsanlage;

Herrn Dr. H. Oldiges, Leiter des Fraunhofer-Instituts in Grafschaft/Schmallenberg, für die freundliche Unterstützung bei der Applikation von Dimethylnitrosamin;

den Mitarbeiterinnen Fr. U. Hennings und Frau H. Landmann für die ausgezeichnete technische Assistenz.

Lebenslauf

Als Tochter der Eheleute Dr. Josef Haydn und seiner Ehefrau Dr. Hildegard, geb. Lafos, wurde ich, Michaela Haydn, am 13. Mai 1958 in Leverkusen geboren. Nach vier Klassen Volksschule besuchte ich von 1967 an das Freiherr-von-Stein Gymnasium in Leverkusen, das ich 1976 mit dem Abitur abschloß.
Mit dem Wintersemester 1976/1977 begann ich mein Medizin-Studium an der Universität Düsseldorf. Das Physikum bestand ich im August 1978, das 1. Staatsexamen im August 1979 und das 2. Staatsexamen im August 1981. Nach Absolvierung meines praktischen Jahres im Bethesda-Krankenhaus in Duisburg, beendete ich im Oktober 1982 mein medizinisches Studium mit dem 3. Staatsexamen.

Oktober 1982